



第356回東北医学会例会シンポジウム

雑誌名	東北医学雑誌
巻	117
号	1
ページ	19-36
発行年	2005-06
URL	http://hdl.handle.net/10097/51349

第 356 回東北医学会例会シンポジウム

日 時: 平成 16 年 11 月 26 日 (金) 午後 1 時 30 分～

場 所: 艮陵会館 記念ホール (仙台市青葉区広瀬町 3-34)

テーマ: 『グローバル時代の感染症・呼吸器疾患』

【講演Ⅰ】 座長: 東北薬科大学 教授 大野 勲先生

「呼吸器ウィルス感染による慢性閉塞性肺疾患急性増悪の機序と予防法」

東北大学病院 助教授 山谷 睦雄 先生

【講演Ⅱ】 座長: 東北大学病院 副科長 田村 弦先生

「気管支喘息治療の今までとこれから」

東北大学大学院 助教授 佐野公仁夫 先生

【特別講演Ⅰ】 座長: 東北大学大学院 教授 服部 俊夫先生

「日本伝播 HIV-1 集団の遺伝子・分子生物学的解析及び分子力学的構造解析」

国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官 仲宗根 正 先生

【特別講演Ⅱ】 座長: 仙台赤十字病院 第二呼吸器科部長 岡山 博先生

「細胞内寄生菌感染における細菌と宿主の攻防」

京都大学大学院 教授 光山 正雄 先生

呼吸器ウイルス感染による慢性閉塞性肺疾患急性増悪の 機序と予防法

Mechanisms and Prevention of Respiratory Virus Infection-induced COPD Exacerbations

山 谷 睦 雄

東北大学病院 老年・呼吸器内科 助教授

はじめに

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は男性高齢者に好発し、わが国において喫煙習慣および人口の高齢化と共に増加している。喫煙者の 10-15% において COPD が発症することより、COPD の罹患には遺伝因子の関与が考えられている。α1-アンチトリプシン欠損症¹⁾の少ないわが国における COPD 原因遺伝子の候補遺伝子に関して、最近報告が多くなされている。他方で、COPD は主として気道ウイルス感染によって急性増悪を生ずる。本項では COPD の発症候補遺伝子およびウイルス感染と COPD 急性増悪の病態の関係、および予防法について、私達の知見を紹介する。

1. ヘムオキシゲナーゼの抗酸化作用と肺気腫発症遺伝子：気道傷害性の関連

ヘムオキシゲナーゼ (以下、HO) はヘムをビリルビンと鉄に代謝し、産生される一酸化炭素やビリルビン、フェリチンは抗オキシダント作用を有している²⁾。誘導型ヘムオキシゲナーゼ (以下、HO-1) は抗オキシダント作用を持つと考えられている²⁻⁴⁾。HO-1 をあらかじめ誘導しておくと、過酸化水素の曝露による気道上皮傷害が予防できる²⁾。

HO-1 の誘導は HO 遺伝子の 5' 上流に位置する GT 反復配列で制御され、長い GT 反復配列ほど抑制作用が強い。このため、慢性肺気腫患者 101 名 (平均年齢 66.8 歳)、非慢性肺気腫喫煙者 100 名 (平均年齢 67.1 歳) から血液を採取し、慢性肺気腫における遺伝子多型性を比較した⁵⁾。GT 反復配列の長さは 3 つのピークを持って分布し、27 回未満、27-32 回、33 回以上の 3 クラスに分けられた。33 回以上の長い GT 反復配列を持つ割合は非肺気腫に比べて慢性肺気腫において高く認められた⁵⁾。さらに、長い GT 反復配列を遺伝子導入

した細胞では HO-1 遺伝子発現の誘導がより強く抑制された⁵⁾。一方で、長い GT 反復配列を有する対象者の末梢血液白血球から作成した継代細胞は過酸化水素による細胞傷害が強く生じた⁶⁾。したがって、HO-1 遺伝子は喫煙やウイルスなどの傷害性に関与し、肺気腫では傷害を受けやすいと理解された。

2. COPD 急性増悪における呼気一酸化炭素・一酸化炭素ヘモグロビン濃度上昇

ヘムが HO で分解されて発生する一酸化炭素 (CO) は内因性 CO 発生源の大部分を占める。気管支患者、インフルエンザ感染気管支喘息急性増悪時^{7,8)}、あるいはインフルエンザ感染、アレルギー性鼻炎で呼気中 CO 濃度は増加する。また、動脈血 CO ヘモグロビン濃度は気管支喘息や肺炎⁹⁾、肺線維症、COPD 急性増悪時に上昇する。炎症性物質による HO-1 増加の関与が示唆される。

3. ライノウイルス感染の気道細胞活性化

ライノウイルス感染は気管上皮細胞や気管粘膜下腺細胞からの IL-1α、IL-1β、IL-6、IL-8、ムチンなどの放出や細胞接着分子 ICAM-1 合成を増加する (図 1)¹⁰⁻¹²⁾。マスト細胞にライノウイルスを感染させると、IgE および抗 IgE 抗体刺激によるヒスタミンや炎症性サイトカインの放出が促進される¹³⁾。気管粘膜下腺細胞をライノウイルス感染させた培養上清には RANTES や GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) が増加し¹⁴⁾、この培養上清で好酸球を刺激すると、走化性が亢進する。さらに、気道ウイルス感染は二次性細菌感染を誘導することがある。ライノウイルスは気道上皮剥離を生じないが肺炎球菌など細菌の受容体発現亢進を介して細菌感染を

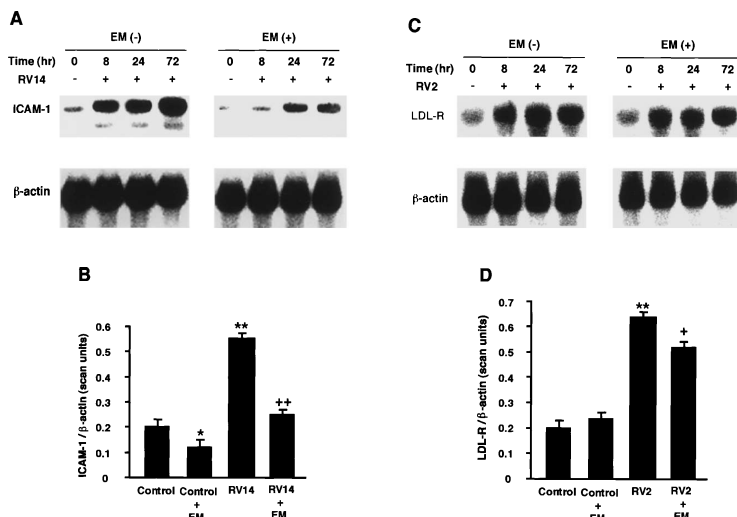


図 1. ヒト気管上皮細胞のライノウイルス感染受容体発現に対するエリスロマイシンの抑制作用
ヒト気管上皮細胞の ICAM-1 mRNA 発現は 14 型ライノウイルス感染で増加する (A, B)。また, LDL 受容体 mRNA 発現も 2 型ライノウイルス感染で増加する。ヒト気管上皮細胞の ICAM-1 発現 (A, B) はエリスロマイシン投与で 14 型ライノウイルス感染前および感染後に減少する。ヒト気管上皮細胞の LDL 受容体発現 (C, D) はエリスロマイシン投与で 2 型ライノウイルス感染後に減少する。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, : コントロールに対する有意差。+ $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$: ウイルスだけに対する有意差。(文献 16 より引用)

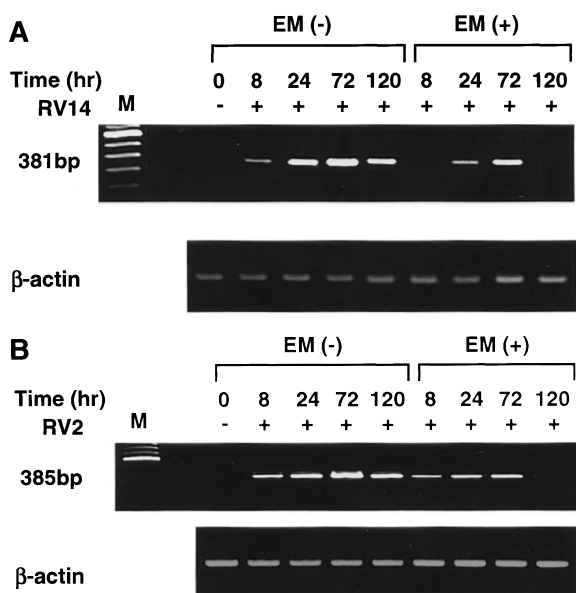


図 2. 細胞内ライノウイルス RNA 複製に対するエリスロマイシンの効果
細胞内ライノウイルス 14 型 (A) および 2 型 (B) RNA は時間経過で増加する。エリスロマイシンは 2 型および 14 型ライノウイルス RNA 複製を減少させる。抑制効果は 14 型で強く, 2 型ではエリスロマイシンの抑制効果が弱い。(文献 16 より引用)

促進すると示唆される¹⁵⁾。

4. エリスロマイシンのライノウイルス感染抑制効果

ヒト気管上皮細胞にエリスロマイシンを作用させると、細胞内ライノウイルス RNA 量、培養液ライノウイ

ルス量、培養液サイトカインは減少する (図 2)¹⁶⁾。エリスロマイシンは ICAM-1mRNA 合成も共に減少させる (図 1)。ライノウイルス RNA 進入経路である酸性エンドゾームは蛍光色素によって細胞内で顆粒状に染色される。エリスロマイシンは酸性エンドゾームの数も蛍光強度も時間依存的に減少する (図 3)。感染受容体と RNA 進入経路の抑制を介したライノウイルス

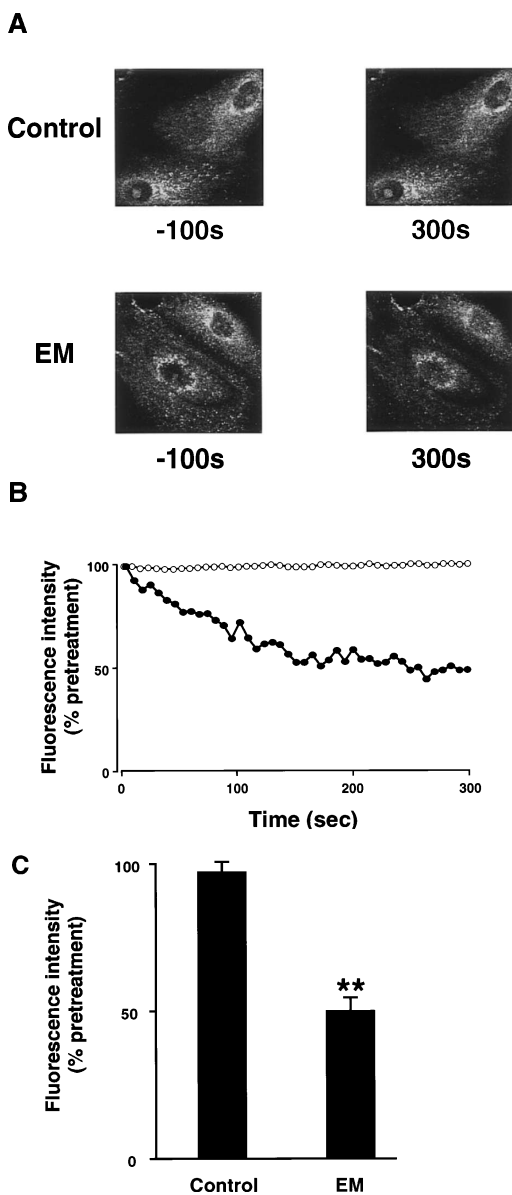


図 3. ヒト気管上皮細胞の酸性エンドゾームに対するエリスロマイシンの抑制効果
ヒト気管上皮細胞の酸性エンドゾームは蛍光色素で顆粒状に染色される (A)。酸性エンドゾームからの緑色
蛍光は時間依存的にエリスロマイシンで減少する (B) (C)。(文献 16 より引用)

表 1. COPD における風邪・急性増悪回数に対するエリスロマイシンの予防効果

項目	コントロール群 (54 名)	エリスロマイシン 内服群 (55 名)	P
風邪総数	245	67	0.0002
急性増悪回数	64	14	<0.0001
急性増悪患者数	30	6	<0.0001
重篤な急性増悪 になった患者数	10	0	0.0004

エリスロマイシン内服 COPD (内服群) においては風邪の回数, 急性増悪を生じた回数, 患者数ともに減少する。(文献 17 より引用)

感染抑制が示唆された。

5. エリスロマイシンの COPD 患者における風邪予防効果

COPD 患者の風邪および急性増悪の回数に対するエリスロマイシンの効果を調べた。COPD 患者 (慢性肺気腫あるいは慢性気管支炎) 109 名を 2 群に分け, エリスロマイシン内服群 55 名 (平均年齢 69.1 歳), 非内服群 54 名 (平均年齢 71.7 歳) を対象に, 患者の同意を得て, 12 ケ月に渡って調査した¹⁷⁾。風邪回数はエリスロマイシン内服群で減少した (表 1)。また, 風邪がもとで急性増悪した患者数もエリスロマイシン内服群で減少した。マクロライドによる COPD 風邪および急性増悪予防効果が示唆された (保険適応外)。

文 献

- 1) Laurell, C.B. and Eriksson, S. (1963) The electrophoretic α 1-globulin pattern of serum in α 1-antitrypsin deficiency. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **15**, 132-140.
- 2) Yamada N., Yamaya, M., Okinaga, S., et al. (1999) Protective effects of heme oxygenase-1 against oxidant-induced injury in the cultured human tracheal epithelium. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **21**, 428-435.
- 3) Otterbein, L., Sylvester, S.L., and Choi, A.M.K. (1995) Hemoglobin provides protection against lethal endotoxemia in rats: the role of heme oxygenase-1. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **13**, 595-601.
- 4) Fukushima, T., Okinaga, S., Sekizawa, K., et al. (1995) The role of carbon monoxide in lucigenin-dependent chemiluminescence of rat alveolar macrophages. *Eur. J. Pharmacol.*, **289**, 103-107.
- 5) Yamada, N., Yamaya, M., Okinaga, S., et al. (2000) Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am. J. Hum. Genet.*, **66**, 187-195.
- 6) Hirai, H., Kubo, H., Yamaya, M., et al. (2003) Microsatellite polymorphism in heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to oxidant-induced apoptosis in lymphoblastoid cell lines. *Blood*, **102**, 1619-1621.
- 7) Zayasu, K., Sekizawa, K., Okinaga, S., et al. (1997) Increased carbon monoxide in exhaled air of asthmatic patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **156**, 1140-1143.
- 8) Yamaya, M., Sekizawa, K., Ishizuka, S., et al. (1999) Exhaled carbon monoxide levels during treatment of acute asthma. *Eur. Respir. J.*, **13**, 757-760.
- 9) Yasuda, H., Yamaya, M., Yanai, M. et al. (2002) Increased blood carboxyhaemoglobin concentrations in inflammatory pulmonary diseases. *Thorax*, **57**, 779-783.
- 10) Subauste, M.C., Jacoby, D.B., Richards, S.M. et al. (1995) Infection of a human respiratory epithelial cell line with rhinovirus. *J. Clin. Invest.*, **96**, 549-557.
- 11) Terajima, M., Yamaya, M., Sekizawa, K., et al. (1997) Rhinovirus infection of primary cultures of human tracheal epithelium: role of ICAM-1 and IL-1 β . *Am. J. Physiol.*, **273**, L749-L759.
- 12) Yamaya, M., Sekizawa, K., Suzuki, T., et al. (1999) Infection of human respiratory submucosal glands with rhinovirus: effects on cytokine and ICAM-1 production. *Am. J. Physiol.*, **277**, L362-L371.

- 13) Hosoda, M., Yamaya, M., Suzuki, T., et al. (2002) Effects of rhinovirus infection on histamine and cytokine production by cell lines from human mast cells and basophils. *J. Immunol.*, **169**, 1482-1491.
- 14) Furukawa, E., Ohnishi, T., Yamaya, M., et al. (2004) Human airway submucosal glands augment chemotaxis during rhinovirus infection. *Clin. Exp. Allergy*, **34**, 704-711.
- 15) Ishizuka, S., Yamaya, M., Suzuki, T. et al. (2003) Effects of rhinovirus infection on the adherence of *Streptococcus pneumoniae* to cultured human airway epithelial cells. *J. Infect. Dis.*, **188**, 1928-1939.
- 16) Suzuki T, Yamaya, M., Sekizawa, K., et al. (2002) Erythromycin inhibits rhinovirus infection in cultured human tracheal epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **165**, 1113-1118.
- 17) Suzuki, T., Yanai, M., Yamaya, M., et al. (2001) Erythromycin and common cold in COPD. *Chest*, **120**, 730-733.

気管支喘息治療の今までとこれから

Treatment of Bronchial Asthma: Up to Now and from Now on

佐 野 公 仁 夫

東北大学大学院 感染症・呼吸器病態学分野

1. はじめに — アレルギーの根源 Th2 細胞

気管支喘息は、気道の可逆的狭窄が原因である。かつては、気道平滑筋の収縮が喘息の主原因と説明されていた。近年は、気道粘膜の慢性炎症が一番重要な因子であると考えられている。

アレルギーの炎症には、さまざまな細胞や因子が関与する。好酸球、肥満細胞、好塩基球などの炎症性細胞、炎症性細胞から分泌されるサイトカイン、あるいは IgE 抗体などである。これらが、気管支喘息炎症の場で実行部隊として喘息を悪化させるが、司令官として命令を下しているのは Th2 細胞である。Th2 細胞は IL-4 や IL-5, IL-13 などを生産し、結果的にアレルギー性炎症を誘発する。

アレルギー性炎症はステロイド治療への感受性が高く、中でも副作用の少ない吸入ステロイドによる治療が世界的に推奨されている。吸入ステロイドによって気道炎症を抑制して症状を緩解させ、同時に発作の予防となる。

しかし、ステロイドによる抗炎症治療も、あるいは平滑筋に的を絞った気管支拡張治療も、いずれも対症療法であり、原因となっている Th2 細胞は放置したままである。従って、アレルギーの原因である Th2 細胞の調節に的を絞った免疫療法の開発が、未来の治療法として期待されている。

2. Th2 細胞の抑制役としての Th1 細胞

免疫療法で Th2 細胞抑制を考えた場合、真っ先に思い浮かぶ細胞は Th1 細胞である。Th1 細胞と Th2 細胞は、お互いに相手方を抑制する能力を持つ。どちらの細胞も、もともとは共通の先祖から分化するが、分化・成熟する環境の違いのために、お互いに抑制的な細胞になってしまう。

Th1 細胞を治療に操るには、まず Th1 細胞がどのような状況下で誘導される細胞であるかを知る必要がある。Th1 細胞は、いろいろな感染症で生体を防御する

際に重要な役割を担う。

特に、細胞内寄生体、例えば結核や、リステリア、マラリアなどの感染時に必須である。これらの感染時には、通常の細菌感染と同じように、マクロファージが病原体を貪食して分解しようと試みる。しかし、これらの病原体はマクロファージによる分解からうまく逃れる技を備えており、結果的にマクロファージは任務を全うする前に息絶える。

ところが、防衛軍もタダでは死ななかった。容易に分解できない微生物を抱えたマクロファージは、戦況が思わしくないメッセージとして、大量の IL-12 を産生する。IL-12 が Th1 細胞に作用すると、次に Th1 細胞からマクロファージに援軍が届けられる。この贈り物が IFN- γ である。瀕死の状態で藻掻いているマクロファージも、IFN- γ を受け取ると、俄然元気を回復する。IFN- γ で活性化されたマクロファージは消化能力を高め、それまで消化しきれなかった細胞内微生物を効率的に破壊する。この結果、戦線は一気に防衛軍側優位へと転換し、感染症完治という勝利宣言でこの戦いは終わる。

3. Th1 誘導と CpG DNA

では、Th1 細胞はいったいどこからやってくるのであろうか？ 実は、マクロファージが苦戦しながら IL-12 を産生している時に、リンパ節では Th1 細胞が誘導されていたのである。

Th1 細胞はナイーブ T 細胞という新生 T 細胞から誘導される。胸腺での教育を終えたばかりで、まだ実際の戦いに参加したことのない、つまり抗原に出会ったことのない T 細胞である。実践経験が無いナイーブ細胞を Th1 細胞へと分化させるには、樹状細胞という特別の新人教育担当細胞が必要である。感染した組織にいた樹状細胞は、マクロファージと同じように病原体をとりこみ、そして分解に窮して IL-12 を産生する。それはちょうど、樹状細胞が近くのリンパ節への移動を完了した頃に一致する。リンパ節で樹状細胞が

ら IL-12 を受け取ったナイーブ T 細胞は、戦闘能力を備えた Th1 細胞へと分化し、感染現場という戦場へと出征していく。なお、実際には、樹状細胞による抗原提示と補助刺激分子の発現、そして抗原特異的 T 細胞の選択的活性化などの制限もあるが、ここでは詳述を省くこととする。

いったい何が、樹状細胞に IL-12 産生を促すのだろうか？ 一番強力なものは、細菌の DNA である。細菌に限らず微生物の DNA には CpG 配列と呼ばれる配列が多く含まれる。この配列は、ほ乳類の DNA には稀な配列である。我々から眺めると、この CpG 配列は異物であり、また病原体感染の証拠でもある。生物は CpG 配列を利用する知恵を進化の中で獲得した。すなわち、CpG 配列を認識した時には、病原体排除に都合のよい免疫反応を誘導する。その一つが先に述べた IL-12 の産生である。

CpG 配列を認識する体内受容体を toll-like receptor (TLR)9 と呼ぶ。TLR とは、微生物に特徴的な構造物を見分ける受容体の総称で、10 種類余りある。微生物由来の、CpG 配列を含む DNA が TLR9 と反応すると、樹状細胞が活性化され、IL-12 産生などを介して、Th1 細胞を分化・誘導する。

4. CpG DNA による気道好酸球性炎症の抑制

ここで、再び喘息治療の話に戻ろう。どのようにして喘息で過剰反応をおこしている Th2 細胞を抑制できるか、そしてそのためにはどのようにして Th1 細胞を活用できるかが命題であった。すでに述べたように、CpG 配列を含む DNA (CpG DNA) は強力に Th1 細胞を誘導するので、これを活用する方法を探ってみる。まずは、動物の喘息モデルで効果を検証する。

マウスの喘息モデルで、CpG DNA を投与すると、気道好酸球性炎症は軽減される。ただし、大量の CpG DNA が必要となる。前述したように、CpG DNA はそれ自体微生物感染と同義であり、LPS のように生体の強い炎症反応を誘発する。そこで、できれば CpG DNA の投与量は最小限にしたい。そのための工夫が、アレルゲンと CpG DNA を同時に投与する試みである。この方法を用いれば、少ない量の CpG DNA でも治療効果を発揮することがわかった。しかし、もっとよい方法はないだろうか？

そこで試しに、CpG DNA とアレルゲンを結合してみることにした。化学的に結合するので、CpG DNA とアレルゲンは一緒に行動することになる。その結果、気道の好酸球性炎症に対する抑制効果は、何と 100 倍増強した。つまり、結合することによって、それまでのわずか 100 分の 1 量の薬物で同程度の治療効果を得られるのであり、それだけ副作用を減らすことができる。

CpG DNA とアレルゲン結合体は、アレルゲン特異的に作用した。たとえばダニによっておこる喘息には、ダニと CpG DNA の結合体が有効であるが、花粉症を治療するならスギ花粉を CpG DNA と結合する必要がある。これはステロイドなどの非特異的治療と一線を画すものである。つまり、ステロイドはすべての免疫を弱めるが、CpG DNA とアレルゲンの結合体は、このアレルゲンが関連する免疫反応以外には何の影響も及ぼさない。例えば、感染に対する抵抗力を弱める懸念が全く無いのである。

CpG DNA とアレルゲンを結合すると、なぜ抗アレルギー作用が増強されるのであろうか？ アレルゲンに CpG DNA が結合してあると、アレルゲンの抗原提示細胞への取り込みが増えるのであった。

従来、細胞外の DNA は細胞内には簡単には取り込まれないと考えられていた。しかし、もともと DNA には糊のようにベタベタと細胞に付着しやすい性質を備えていることが分かった。細胞外 DNA は、細胞膜に発現されている DNA に対する受容体と反応した後に細胞内に取り込まれる (receptor-mediated endocytosis)。CpG 配列を含む DNA にアレルゲンが結合してあると、アレルゲンも樹状細胞内に同時にとりこまれる。とりこまれたアレルゲンは、ペプチドとなって樹状細胞上に MHC とともに提示され、T 細胞によって認識されるのを待つこととなる。

5. 終わりに — 未来の免疫療法

アレルゲンと CpG DNA 結合体は、すでに人での臨床試験が始まっており、有効性が認められている。ブタクサ抗原を CpG DNA と結合して、1 週間感覚で 6 回注射するだけで、翌年のブタクサシーズンまでその効果が持続する。新しい免疫療法として登場するのも、間近い。

日本伝播 HIV-1 集団の遺伝子・分子生物学的解析及び 分子力学的構造解析

Genetical, Molecular Biological and Molecular Structural Analysis of Japanese HIV-1 Population

仲 宗 根 正

国立感染症研究所・エイズ研究センター

はじめに

AIDS 及び HIV 発見から既に 20 年以上が過ぎた。この間に感染者は 4,000 万人を突破し、いまや地球人 160 人中 1 名の割合に達した。死亡者は年間 300 万人を越え、新規感染者数・死亡者数ともにその増加に歯止めがかからない。予防啓蒙活動や効果的な治療薬の出現により勢いは衰えたとは言え、完全制圧にはほど

遠い。有効なワクチン開発のめどがたっていないからである。効果的なワクチン開発に最も必要なのは敵の情報である。国立感染症研究所エイズ研究センターでは 1988 年から日本の HIV-1 を収集し解析している。本稿では、その日本伝播 HIV-1 集団の遺伝子・分子生物学的解析及び分子力学的構造解析による敵の情報をまとめてみたい。

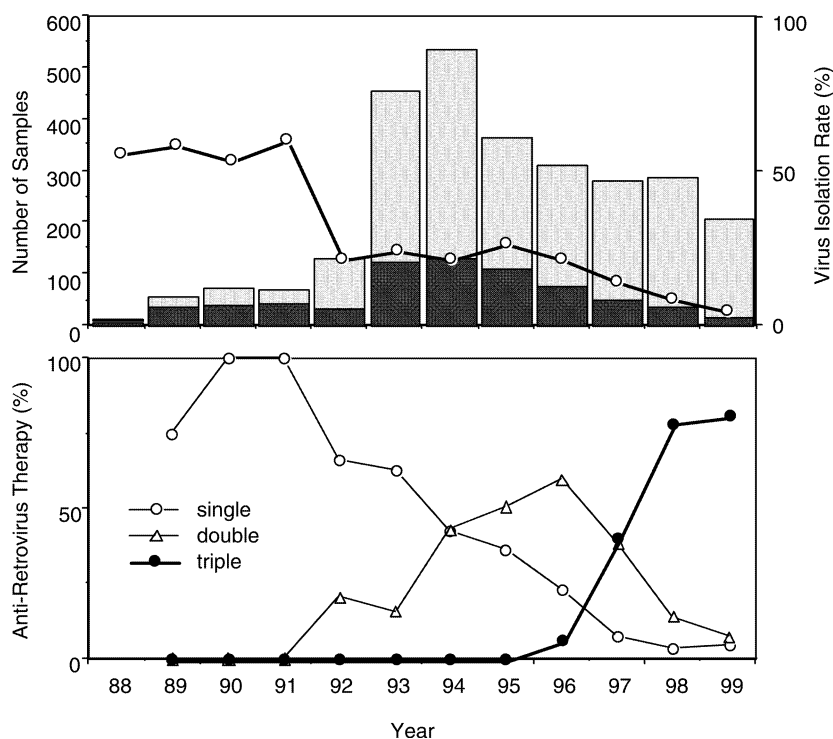


図 1. Decline in the HIV-1 isolation rate in Japan, and annual changes of anti-HIV-1 chemotherapy from 1988 to 1999.

Microbiology and Immunology 2000

対象と方法

日本伝播 HIV-1 (614 例, サンプル, 1988 年～1999 年) を対象とした。まずウイルス生物学的指標としてウイルス分離率を用い, これを 12 年間観察した。次に HIV-V3 部の遺伝子解析を行い, 日本の HIV 集団の遺伝子学的多様性を検討し, その経年的変化を観察した。最後にホモロジーモデリングの手法により, HIV-V3 部遺伝子配列から演繹されるアミノ酸配列を経て計算科学的に推測される蛋白構造を MOE (Molecular Operating Environment: カナダ CCG 社製蛋白

構造解析ソフト) により算出し, この分子力学的構造の多様性について経年的変化を観察した。

日本伝播 HIV-1 のウイルス分離率の低下 1988-1999 年のウイルス分離率の推移を見ると, 1992 年前後と 1997 年前後の 2 個所に転換点が確認できた (図 1)。これは, AZT 普及時期と HAART 療法開始時期にそれぞれ一致しており, 治療効果をウイルス生物学的に証明するデータである可能性が示唆された。すなわち, 日本の HIV-1 集団は治療によりウイルス生物学的に良く制御されていると言える¹⁾。

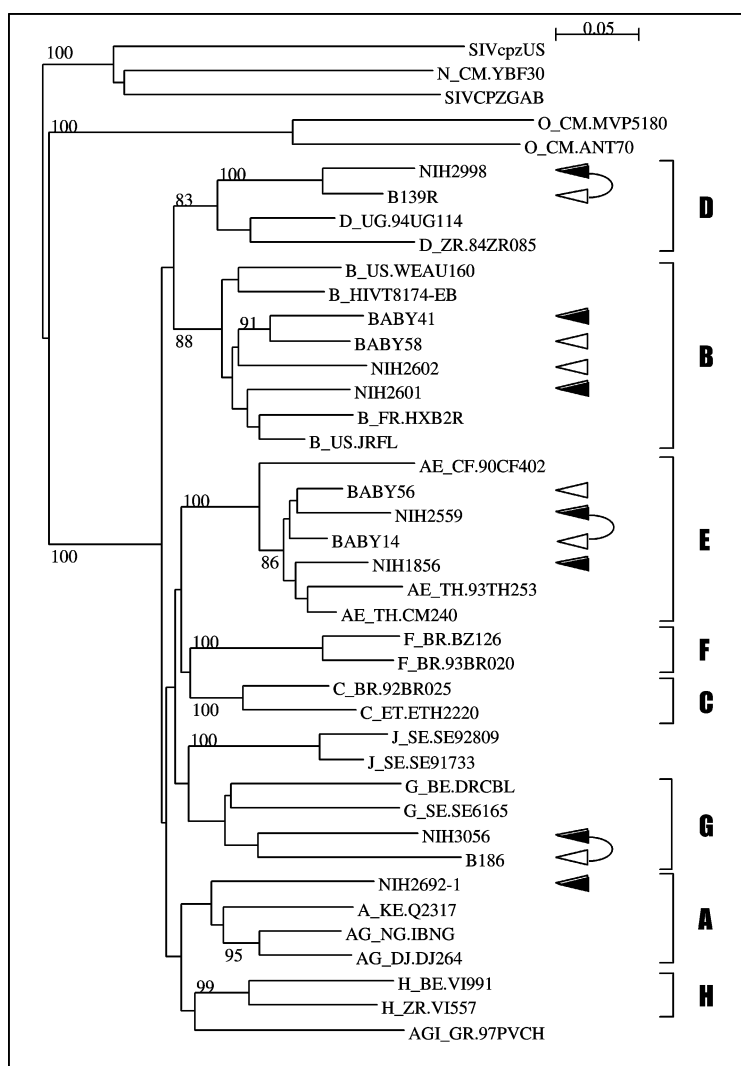


図 2. Presence of Multiple HIV-1 Subtypes among Mothers and Children in Japan
AIDS Research and Human Retroviruses 2001

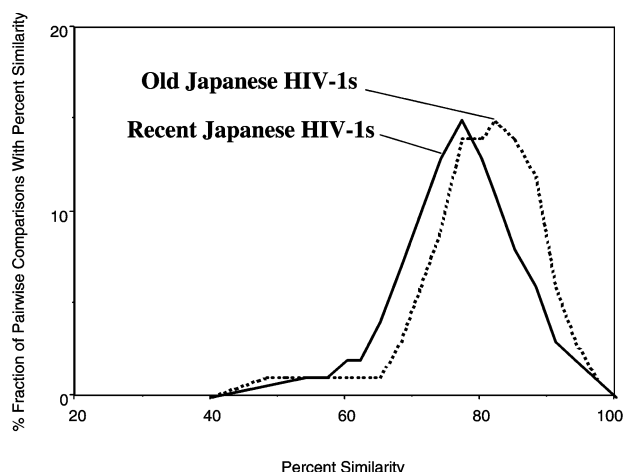


図 3. Comparison of similarity distribution between Old Japanese HIV-1 subtype B (1989-1993) and Recent Japanese HIV-1 subtype B (1996-1999)

日本伝播 HIV-1 の遺伝子学的多様性

日本の HIV-1 集団は遺伝子学的に Subtype B が主流ではあるが, Subtype A, D, E, G の流入が確認された (図 2). すなわち, 日本の HIV-1 集団は様々な Subtype (A, B, D, E, G) が混在する雑多な集団である²⁻⁵⁾.

日本伝播 HIV-1 の遺伝子学的多様性と構造学的多様性の推移

Subtype B に限れば, 日本への流入初期の HIV-1 Subtype B 集団 (1988-93 年: 91 症例) と, ここ数年の HIV-1 Subtype B 集団 (1996-99 年: 84 症例) の V3 遺伝子多様性と V3 推定構造の多様性は, 急速に増大する方向へは推移していない (図 3). すなわち, その遺伝子学的多様性と構造学的多様性をほぼ維持している HIV-1 Subtype B 集団である. 加えて, 新たに開発した蛋白構造系統樹解析 (MOE で動作) によると, 日本の HIV-1 Subtype B 集団は 10 年ほどの時間を経ても, その構造学的多様性は決まった傾向を持たずに推移していることが示唆された⁶⁻⁷⁾ (図 4).

新規解析手法・HIV 逆転写酵素活性高感度測定法の開発

HIV の最大の特徴は逆転写酵素 (RT) の存在である. しかしながら臨床株においてその活性は殆ど解析

されていない. 既存の方法は感度が低いため, 殆どの臨床株 RT は測定感度以下となるからである. 一方で, 前述通り最大の特徴である RT 活性を解析することは HIV の最大の情報を手に入れることにつながり, 薬剤耐性 HIV の解析のみならずワクチン開発にも大きく貢献すると考えられる. そこで HIV 逆転写酵素活性高感度測定法を開発した (図 5). 本法は 1995 年に山本と Heneine ら⁸⁾ が開発した Amp-RT をより簡便な方法に改良したものである⁹⁾. これにより日本伝播 HIV-1 集団のウイルス酵素学的解析が可能となった. そればかりか薬剤耐性 RT 活性の迅速測定への応用や, HIV-1 を離れて新規レトロウイルススクリーニング法への応用が期待される.

HIV 感染症統合データベースの開発

本稿で述べてきたデータは, HIV 関連研究者に活用してもらうことを目的として HIV 感染症統合データベース (DB)¹⁰⁾ に搭載されている (URL <https://aids.nih.go.jp>). DB は, 平成 17 年 3 月末現在, DDBJ の HIV 遺伝子 DB に加えて, 提供 HIV 感染者 572, ウィルス分離解析数 3217, C2V3 遺伝子解析数 361, V3 部蛋白構造解析数 361 (PDB 形式), 対応臨床データ (生年, 性別, CD4 細胞数, ウィルス量, 薬剤履歴, その他) からなる. 主機能は, DDBJ の HIV 遺伝子データに対する遺伝子相同性検索, 遺伝子系統樹解析, genosubtyping, 独自の division 作成機能, V3 部蛋白 3 次元構造の閲覧機能, 臨床データ検索機能である. こ

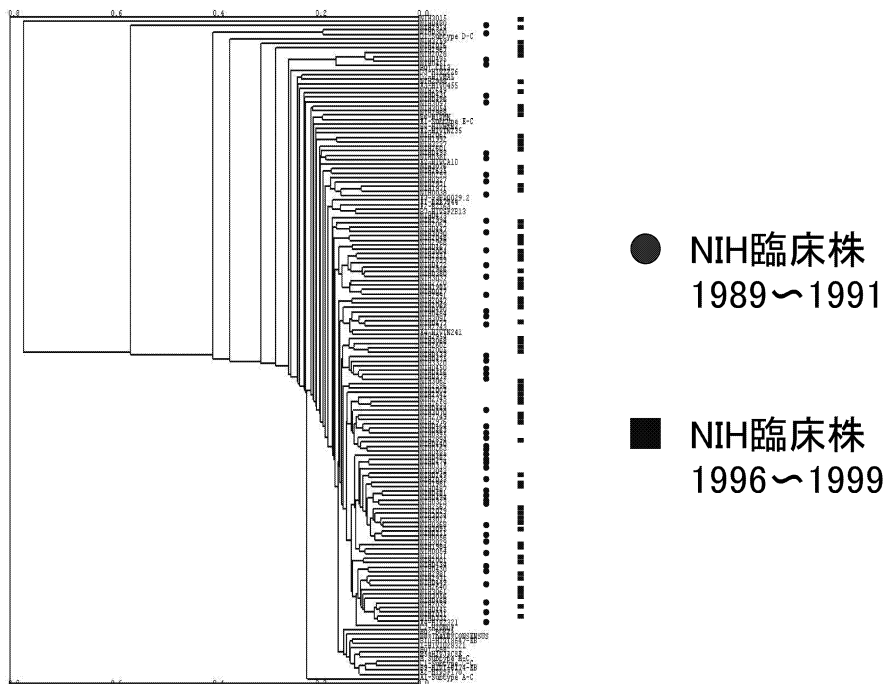


図 4. MOE を用いた V3 部蛋白分子力学的系統樹

● NIH 臨床株 1989～1991

■ NIH 臨床株 1996～1999

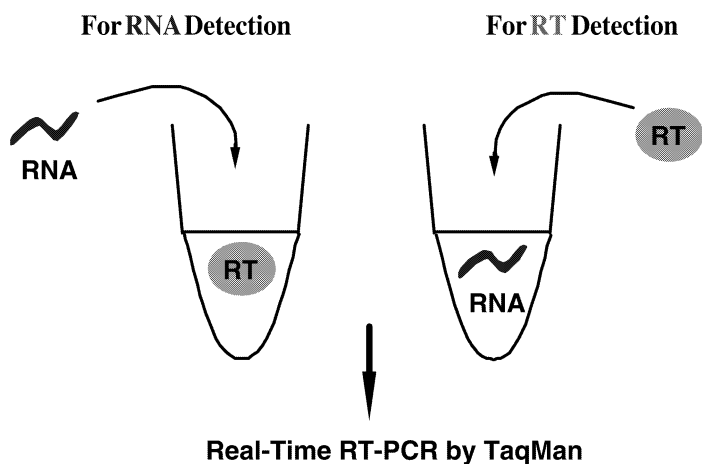


図 5. HIV 逆転写酵素活性高感度測定法の原理

の統合化された DB の有効活用によりエイズワクチン・薬剤開発の進展が期待できる。

ま と め

HIV/AIDS ワクチンの最大の障壁は HIV の多様性である。しかしながら HIV も生物である以上、多様性は無限ではなく、限界があるはずである。その限界が

把握できれば少なくともそれを包括したワクチン開発戦略が立てられる。この概念はシンプルではあるが、実際に多様性の限界を突き止めるのは途方もなく困難である。だからと言って諦める訳にはいかない。地道な作業を根気よく進めるべきである。今回示したように、日本の HIV-1 集団の中のサブタイプ B 集団は、遺伝子学的にも構造学的にも多様性は大きく進んではない。少なくともここ 10 年ほどで見れば飽和状態になりつつあると考えられる。もっともこの集団は世界の HIV-1 集団から見れば極めて小さい集団である。多様性の限界を突き止める第 1 歩ではあるが先は長い。

文 献

- 1) Nakasone T, Takamatsu J, Watanabe K, et al. (2000). Decline in the HIV-1 isolation rate in Japan: A 12 year observation. *Microbiology Immunology*, **44**, 949-952.
- 2) Nakasone T, Hara T, Yoshino N, and Honda M. (2004) Update on HIV/AIDS in Japan, 2003. Eds. Lu, Y., and Essex, M. HIV in Asia. *Kluwer Academic Publishers.*, 72-78.
- 3) Nakasone T, Totani R, Yamazaki S, and Honda M. (1998) HIV-1 subtype A in Japan. *AIDS*, **12**, 950-952.
- 4) Yoshino N, Naganawa S, Nakasone T, et al. (1998) Vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in Japan, 1989-1997: presence of two subtypes B and E with subtype E predominance. *Acta Paediatrica Japonica*, **40**, 503-508.
- 5) Hara T, Yoshino N, Takayama N, et al. (2001) Presence of multiple HIV type 1 subtypes among mothers and children in Japan. *AIDS Research and Human Retroviruses*, **17**, 569-575.
- 6) 仲宗根正, 北村勝彦, 渡邊くほみ, 他 (1994) 遺伝子解析より見た HIV 感染症の現況と将来. *臨床医* **20**, 356-360.
- 7) 仲宗根正, 原 敬志, 本多三男 (2003) 日本伝播 HIV-1 集団の遺伝子・分子生物学的解析及び分子力学的構造解析. 国立感染症研究所平成 14 年度年報, 314-315.
- 8) Heneine W, Yamamoto S, Switzer WM, et al. (1995) Detection of reverse transcriptase by a highly sensitive assay in sera from persons infected with human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Infectious Diseases*, **171**, 1210-1216.
- 9) 仲宗根正, 本多三男, Walid Heneine. (2004) 逆転写酵素活性 (RT) 高感度測定法を用いた薬剤耐性 HIV-RT 定量法の開発. 国立感染症研究所平成 15 年度年報, 351.
- 10) 仲宗根正, 原 敬志, 染谷健二, 他 (2004) HIV 感染症統合データベースの開発. *日本エイズ学会誌* **6**, 42-49.

細胞内寄生菌感染における細菌と宿主の攻防

Host-parasite Interaction in the Infection with Intracellular Parasitic Bacteria

光 山 正 雄

京都大学大学院医学研究科 感染・免疫学講座・微生物感染症学

I. はじめに

食細胞は感染防御において最も重要なエフェクターであり、大半の細菌は貪食されるとその細胞内殺菌機構により殺菌されてしまう。しかし、病原細菌のなかには食細胞の細胞内殺菌を回避して細胞内増殖が可能な細菌が存在し、通性細胞内寄生菌とよぶ。結核菌、リステリア、レジオネラ、プルセラなどがそうで、感染防御の第一線を担う食細胞で殺菌されないため健常宿主にも強い病原性を示す。リステリア (*Listeria monocytogenes*) は、マウスに強い T 細胞応答を誘導し強力な再感染抵抗性を成立させるので、T 細胞依存的感染防御免疫研究のモデルとして広く用いられてきている。何故この細菌感染では強力な TH1 応答が誘導できるのか不明であったが、我々の最近の研究によって、リステリアが細胞内殺菌をエスケープする上で最も主要な病原因子であるタンパク毒素、リステリオリシン (Listeriolysin O, LLO) が、同時に強い宿主

サイトカイン誘導活性も有し感染宿主免疫応答を誘導する上で必須の役割を果たすことが明らかになってきた。

II. リステリアの殺菌エスケープにおける LLO の役割

リステリアは細胞内殺菌機構の発達したマクロファージ (Mφ) 内で生存増殖するための病原遺伝子群をもち、溶血性タンパク LLO をコードする *hly*, 2 種のフォスホリパーゼ遺伝子 (*plcA*, *plcB*)、メタロプロテアーゼ (*mpl*)、ActA タンパク遺伝子 (*actA*) などが、最上流に位置する調節遺伝子 *prfA* に制御を受ける形で配列されている¹⁾。菌が食細胞の殺菌をエスケープするには、食胞から脱出するか食胞とリソソムの融合を阻止する必要がある。リステリアは食胞を脱出して細胞質で増殖するタイプの代表的な菌で、*hly* 産物である LLO の膜傷害活性によって食胞膜を傷害

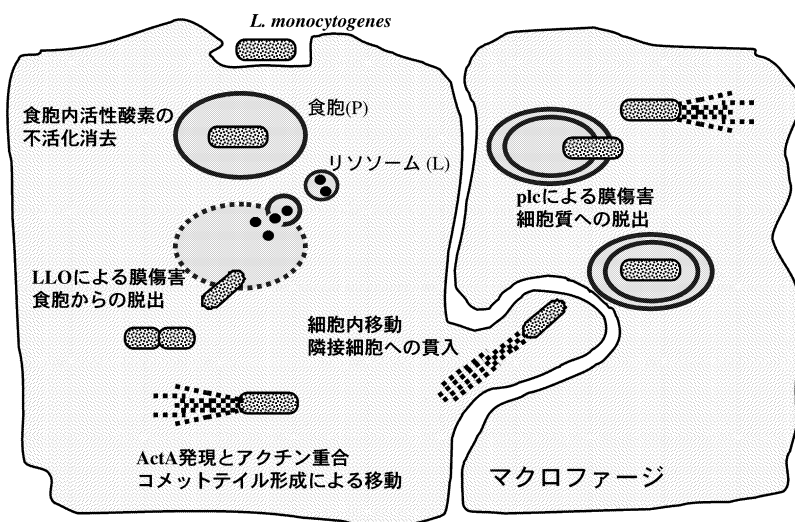


図 1. リステリアのマクロファージ内での食胞からのエスケープと細胞内増殖

し細胞質へと脱出する。細胞質に脱出すると、菌体端に発現される ActA タンパクが宿主細胞質内のアクチン重合を促し、いわゆるコメットテイルを形成してその力を利用して細胞質内を動き回ることができる。細胞質内での移動の結果隣接細胞へ貫入できた菌は、2 重に被った脂質膜のリン脂質を 2 種のフォスホリパーゼで分解し、隣接細胞の細胞質内へ感染を拡大する (図 1)。このうち *hly* 遺伝子とその産物 LLO がエスケープ因子のなかでも最も重要なものである。

LLO は 25 アミノ酸のシグナルペプチドと 504 アミノ酸の分泌タンパクから成る単純タンパクで、血液寒天培地での溶血に関与することから溶血素として知られてきた。この種の溶血タンパクは化膿レンサ球菌の streptolysin O (SLO) をはじめ各種グラム陽性菌により産生され、コレステロール含有細胞膜にオリゴマーとなって膜貫通性の孔 (pore) を形成するので、cholesterol-dependent pore-forming cytolysin (CDC) とよばれる。しかし CDC タンパクが細胞内寄生と食胞膜からの脱出に関わるのは、リステリア属の *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* の 3 菌種のみに限られる。

III. リステリアに対する宿主免疫応答への LLO の関与

致死菌量以下のリステリアを健常マウスに感染させると肝脾で一旦増殖するが、徐々に臓器内菌数は減少し 10 日以内に完全排除される。感染から快復したマウスに再度攻撃感染を行うと、今度は全く菌の増殖がみられず病状も呈さない。このような獲得抵抗性の発現には抗体は全く関与せず、完全に T 細胞依存性である。感染を耐過したマウスには、リステリア特異的で MHC クラス II 拘束的な Th1 細胞と、MHC クラス I 拘束的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の分化誘導がみられる。獲得免疫が成立すると、菌が増殖しているマクロファージや肝実質細胞を CTL が傷害して内部の菌を遊離させ、さらに Th1 細胞や CTL 由来の γ インターフェロン ($\text{IFN-}\gamma$) により活性化された $\text{M}\phi$ が菌を貪食し、生成が亢進した活性酸素群や一酸化窒素 (NO) ラジカルによって細胞内殺菌が起り排除できると考えられる²⁾。

リステリア感染 (生菌免疫) では初期から宿主に強いサイトカイン産生応答がみられ、感染を耐過すると強い Th1 応答がみられるが、死菌や菌体成分による免疫では内因性 $\text{IFN-}\gamma$ 産生誘導や感染防御免疫の誘導は困難である。我々は死菌のみならず生菌でもサイト

カイン誘導活性や獲得免疫誘導能の低い菌株を見出し、これが LLO 非産生株であることから、LLO 産生能の高いことが Th1 応答の誘導に必須であろうと考えた³⁾。そこで生菌の培養上清から LLO タンパク (native LLO: nLLO) を精製し、nLLO には還元条件下で強い細胞傷害活性 (溶血活性) があるが、非還元条件やコレステロールによる前処理で細胞傷害活性が発現されない条件では正常マウス脾細胞に対して強い $\text{IFN-}\gamma$ 誘導活性を示すこと、その誘導には脾細胞中の $\text{M}\phi$ と NK 細胞が関与することを見出した⁴⁾。また *in vivo* でも内因性 $\text{IFN-}\gamma$ 活性を中和抑制すると、Th1 型の感染抵抗性 T 細胞の誘導分化が著明に低下することも明らかとなった⁵⁾。さらに詳細な解析を行うために、*hly* 遺伝子の分泌タンパク部分をクローニングし、大腸菌にリコンビナント LLO を産生させて精製 rLLO を得て実験をおこなった。マウス脾細胞における LLO 刺激による $\text{IFN-}\gamma$ 産生応答は、CD11c 陽性細胞や DX5 陽性細胞を抗体ビーズで除去すると著明に低下した。また、 $\text{M}\phi$ が産生すると思われる種々のサイトカインに対する中和抗体を添加した実験では、とくに IL-12 と IL-18 が必須であることが示された。そして、LLO 刺激による IL-12 や IL-18 mRNA の発現は主に CD11b 陽性細胞画分に見られた。さらに IL12 や IL-18 のノックアウトマウスの脾細胞では WT のような LLO による $\text{IFN-}\gamma$ 産生応答がみられなかった⁶⁾。つまり、LLO および類似のサイトカイン誘導活性を持つ CDC タンパクは、まず $\text{M}\phi$ に作用して IL-12 や IL-18 を誘導し、これらが主として NK 細胞に作用して $\text{IFN-}\gamma$ 産生を引き起こすものと考えられた。

IV. LLO が示すサイトカイン産生誘導活性の解析

LLO によるサイトカイン産生誘導の分子機構を明らかにする目的で、各種変異リコンビナント LLO タンパクを作製した。LLO 類似タンパク PFO のドメイン構造と遺伝子配列から、LLO も同様に 4 つのドメインから成ることが推測された⁷⁾。C 末端からの順次欠失変異タンパク、1-3 ドメイン標品、第 4 ドメインのみの標品など多数の変異タンパクを作製した。それらの膜傷害活性と *in vitro* でのサイトカイン誘導活性をしらべたところ、膜傷害活性には第 4 ドメインが必須であり、第 4 ドメイン C 末端近傍に存在し CDC ファミリータンパクに共通して保存されている ECTGLAW-EWWR の配列 (Trp-rich motif) が重要であることが判明した。一方、 $\text{IFN-}\gamma$ 誘導活性の発現には第 4 ドメ

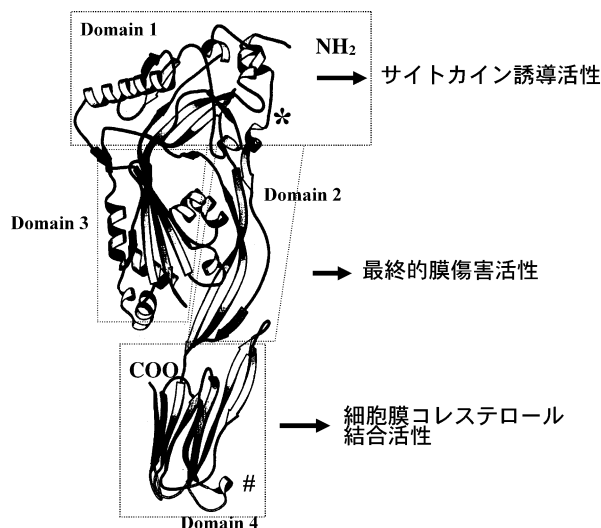


図2. LLO 分子のドメイン構造と各ドメイン依存的な2つの生物活性
(* PEST 配列の位置, # Trp-rich motif の位置)

インの存在は必要ではなく, 1-3 ドメインが重要であることが明らかとなった⁸⁾. この結果から, LLO 分子が示す全く異なった活性 (菌にとって有利な細胞膜傷害活性と宿主に有利な IFN- γ 誘導活性) は, 同一分子上の異なったドメインがそれぞれ中心的役割を果たすことが明解に示された (図2). ドメイン別に担われる同様の活性は, 肺炎球菌の *ply* 遺伝子産物であり CDC ファミリータンパクのひとつである PLY についても示すことができた^{9,10)}.

リステリア属菌のうち *L. monocytogenes* 以外の *L. ivanovii* や *L. seeligeri* も CDC ファミリータンパクを産生する. この2菌種それぞれが産生する ILO と LSO の遺伝子 *ilo*, *lso* を用いて作製したリコンビナント標品を作製したところ, *L. ivanovii* 由来の ILO は LLO よりも高い細胞傷害活性を示したが, LLO のようなサイトカイン誘導活性を認めることができなかった. 実際に *L. ivanovii* 生菌をマウスに感染させると, 感染マウスにおける内因性 IFN- γ の産生応答は *L. monocytogenes* 感染に比べ低く, 感染耐過マウスでの獲得免疫や Th1 細胞の誘導レベルも有意に低いものであった¹¹⁾. 逆に *L. seeligeri* 由来の LSO は ILO とは逆にサイトカイン誘導活性が LLO よりも高く, LLO と同様に 1-3 ドメインだけで充分な IFN- γ 誘導活性を示したにも関わらず, その細胞傷害活性は LLO よりも数倍低値を示した¹²⁾. 細胞傷害活性発現に重要な配列として, 第4ドメインのC末端側に存在し CDC ファミリータンパクに共通して保存されている Trp-

rich motif があるが, LSO のこの部位には1ヶ所アミノ酸が自然変異 (488 Ala \rightarrow Phe) している. そこで LSO 488 アミノ酸を本来共通した Ala に置換した標品, LLO の Ala を LSO と同じく Phe に置換した標品を作製して活性を比較した結果, 488 アミノ酸の Ala \rightarrow Phe 変異が第4ドメインのコレステロール結合活性に影響を及ぼし, 細胞傷害活性に変化を与えることがわかった¹²⁾.

次に, 相同性の高いリステリア属由来の3種類の CDC ファミリータンパクのサイトカイン誘導活性が何故異なるのかについて, 1-3 ドメインのどこかの違いがその活性を規定すると考えられた. LLO の N 末端 25 アミノ酸を欠失させるとサイトカイン誘導活性がほぼ消失することから, 第1ドメインの N 末端近傍を詳細に比較検討した結果, 全配列のうち 15 番アミノ酸までの hydropathy が ILO では他の2種と大きく異なることを見出した. そこで LLO の N 末端 13 アミノ酸を ILO のそれと置換えた標品を作製したところ, LLO が示すべきサイトカイン誘導活性に著明な低下がみられた. このような疎水性を規定する配列のひとつとして PEST 配列が挙げられる. 3種のタンパクのうちサイトカイン誘導活性を示す LLO と LSO にはタンパクの全配列中 N 末端1ヶ所だけに PEST 配列が認められる一方, ILO には PEST 配列が存在しないことが判明した. ILO に PEST 配列が存在しないのは, LLO で 32 番目の K が ILO では Y (Tyr) に置き換わったためであると考えられたので, LLO の K を Y

に置換した変異タンパク標品 (K32Y) を作製した。その結果、溶血素としての細胞傷害活性は何ら障害されなかったにも関わらず、サイトカイン誘導活性だけは著明に低下した¹⁴⁾。以上の結果から、LLO タンパクのサイトカイン誘導活性発現には、N 末端近傍の PEST 配列によって規定される立体構造が重要な役割を果たしていることが示された。

V. 宿主による LLO の認識機構

M ϕ による多様な微生物リガンドの認識の多くには Toll-like receptor (TLR) が関与する。LLO は単純タンパクであり、スーパー抗原活性が認められないにも関わらず M ϕ からのサイトカイン産生を誘導するので、LLO の N 末端側ドメインの立体構造も一種の pattern recognition 機構によって TLR を介したシグナルを送ることが想定された。TLR 2, 4, MyD88 ノックアウトマウス細胞 (大阪大学大審良教授より提供) での応答をしらべた結果、何れのマウス由来の細胞でも野生マウスにみられるような rLLO や rLSO 刺激に対する IFN- γ 産生応答はみられなかった。さらに抗 CD14 抗体を刺激培養に添加すると著明な抑制が観察された。また、HEK293 細胞における LLO 刺激に対する NF- κ B 活性化は、TLR2/TLR4/CD14/MD2 を同時に強制発現させた場合に最も強く、TLR2 や TLR/CD14 を発現させた場合には殆ど応答がみられなかった¹⁵⁾。以上の結果から、少なくとも rLLO を外部からマクロファージに作用させると、ドメイン 1-3 をリガンドとして TLR を介したシグナル経路により NF- κ B 活性化がおこり、強いサイトカイン応答が誘導されると考えられた。

以上の実験結果は全てリコンビナントタンパクによるものであるが、実際の感染ではリステリアは宿主マクロファージ系細胞内で増殖し、菌から放出された LLO が宿主体内を循環することは考えにくい。そこで、実際の感染でもマクロファージの細胞質内で LLO が同様にサイトカイン誘導に作用するのかを明らかにするため、*hly* 遺伝子を in frame で完全に脱落させた *L. monocytogenes* 変異株 (Lm Δ *hly* 株) を作製した。この変異株に、すでに述べた各種変異遺伝子が発現されるように組み込んだプラスミドを安定に保有させ、*in vitro* でマクロファージに感染させた際の細胞質へのエスケープとサイトカイン産生誘導能を現在検討している。Lm 野生株 (LmWT) にみられる食胞外脱出とサイトカイン誘導は Lm Δ *hly* 株では全く消失し、完全長の *hly* 遺伝子を補完した株 (Lm Δ *hly/hly*) で回復し

た。一方、Lm Δ *hly* 株に ILO 遺伝子の *ilo* を発現させた株では、LmWT と同等に食胞からの脱出と細胞質での増殖がみられたにも関わらず、サイトカイン応答の誘導は回復しなかった (Hara H, et al., 投稿準備中)。ILO には PEST 配列が存在しないことによってサイトカイン誘導活性がないと考えられることは既に示したが、細胞質で産生された PEST 配列を有する LLO が、外部からの作用と同様に TLR 2/4 を介してサイトカイン遺伝子発現シグナル経路を活性化するか否かは今後の課題である。

VI. おわりに

従来、細菌の病原因子タンパクは抗原性はあっても、宿主の細胞性免疫応答誘導に関わる知見はみられなかったが、リステリアの中心的病原因子タンパクは本菌の病原性発揮に必須の因子でありながら、同時に宿主に TH1 応答を誘導する上でも必須のサイトカイン誘導因子として作用することが明らかとなった。本稿では割愛したが、腸管上皮細胞など食細胞ではない細胞へのリステリア感染では、LLO の細胞傷害活性が Ca イオン流入を基盤としたサイトカイン誘導に作用することも最近判明してきた¹⁶⁾。細胞内寄生を可能にする菌側の最重要分子を宿主が認識し、最終的に細胞内寄生菌を排除する TH1 細胞誘導応答を示すことは、細菌と宿主相互のせめぎ合いの進化によるものととらえることができる。

文 献

- 1) 光山正雄 (2002) リステリア菌の感染メカニズム。感染・炎症・免疫, **32**, 158-167.
- 2) Ohya, S., Tanabe, Y., Makino, M., et al. (1998) The contribution of reactive oxygen intermediates and reactive nitrogen intermediates to listericidal mechanisms differ in macrophages activated pre- and postinfection. *Infect. Immun.*, **66**, 4043-4049.
- 3) Xiong, H., Kawamura, I., Nishibori, T., et al. (1994) Cytokine gene expression in mice at an early stage of infection with various strains of *Listeria* spp. differing in the virulence. *Infect. Immun.*, **62**, 3649-3654.
- 4) Nishibori, T., Xiong, H., Kawamura, I., et al. (1996) Induction of cytokine gene expression by listeriolysin O and the role of macrophages and NK cells. *Infect. Immun.*, **64**, 3188-3195.
- 5) Yang, J., Mitsuyama M. (1997) An essential role for the endogenous gamma interferon in

- the generation of protective T cells against *Mycobacterium bovis* BCG. *Immunology*, **91**, 529-535.
- 6) Nomura, T., Kawamura, I., Tsuchiya, K., et al. (2002) Essential role of interleukin-12 (IL-12) and IL-18 for gamma interferon production induced by listeriolysin O in mouse spleen cells. *Infect. Immun.*, **70**, 1049-1055.
 - 7) Rossjohn, J., Gilbert, R.J.C., Crane, D., et al. (1997) Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell*, **89**, 685-692.
 - 8) Kohda, C., Kawamura, I., Baba, H., et al. (2002) Dissociated linkage of cytokine-inducing activity and cytotoxicity to different domains of listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.*, **70**, 1334-1341.
 - 9) Baba, H., Kawamura, I., Kohda, C., et al. (2001) Essential role of domain 4 of pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae* in cytolytic activity as determined by truncated proteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **281**, 37-44.
 - 10) Baba, H., Kawamura, I., Kohda, C., et al. (2002) Induction of gamma interferon and nitric oxide by truncated pneumolysin that lacks pore-forming activity. *Infect. Immun.*, **70**, 107-113.
 - 11) Kimoto, T., Kawamura, I., Kohda, C., et al. (2003) Differences in gamma interferon production induced by listeriolysin O and ivanolysin O result in different levels of protective immunity in mice infected with *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii*. *Infect. Immun.*, **71**, 2447-2454.
 - 12) Ito, Y., Kawamura, I., Kohda, C., et al. (2003) Seeligeriolysin O, a cholesterol-dependent cytolysin of *Listeria seeligeri*, induces gamma interferon from spleen cells of mice. *Infect. Immun.*, **71**, 234-2341.
 - 13) Ito, Y., Kawamura, I., Kohda, C., et al. (2001) Difference in cholesterol-binding and cytolytic activities between listeriolysin O and seeligeriolysin O : a possible role of Ala residue of Trp-rich undecapeptide. *FEMS Microbiol. Lett.*, **203**, 185-90.
 - 14) Kimoto, T., Kawamura, I., Kohda, C., et al. (2005) A crucial role of N-terminus region of listeriolysin O for the induction of cytokines in mice. *Infect. Immun.*, submitted.
 - 15) Kawamura, I., Kohda, C., Tsuchiya, K., et al. (2005) Listeriolysin O, a major virulence factor of *Listeria monocytogenes* requires both Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to induce cytokine production in mice. *J. Immunol.* in revision.
 - 16) Tsuchiya, K., Kawamura, I., Takahashi, A., et al. (2005) Listeriolysin O-induced membrane permeation mediates persistent IL-6 production in Caco-2 cells during *Listeria monocytogenes* infection *in vitro*. *Infect. Immun.*, **73**, in press.